



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
1-0022075

(51)⁷ **C07D 307/00, 307/77, A61K 31/343,**
A61P 35/00

(13) **B**

(21) 1-2018-00541

(22) 06.02.2018

(45) 25.10.2019 379

(43) 25.05.2018 362

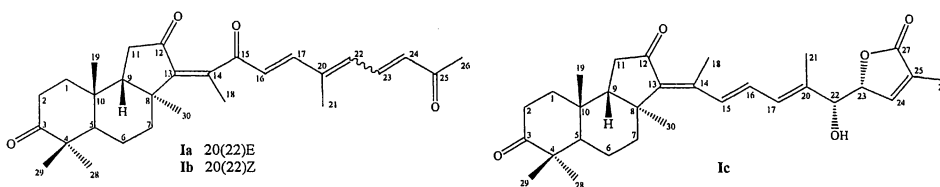
(73) **VIỆN HÓA SINH BIỂN - VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM (VN)**

Số 18 đường Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) **Phan Văn Kiệm (VN), Châu Văn Minh (VN), Nguyễn Hoài Nam (VN), Nguyễn Xuân Nhiệm (VN), Dương Thị Dung (VN), Phạm Hải Yến (VN), Trần Hồng Quang (VN), Bùi Hữu Tài (VN)**

(54) **HỢP CHẤT ISOMALABARICAN VÀ PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP HỢP CHẤT NÀY TỪ LOÀI HẢI MIỀN RHABDASTRELLA PROVIDENTIAE**

(57) **Sáng chế đề cập đến các hợp chất isomalabarican có công thức (I):**



I

và phương pháp phân lập các hợp chất này từ loài hải miên *Rhabdastrella providentiae* thu được tại vùng biển Côn Cỏ, Quảng Trị. Các hợp chất này đều có hoạt tính gây độc tế bào trên năm dòng tế bào ung thư ở người là tế bào ung thư gan (HepG2), ung thư phổi (LU-1), ung thư vú (MCF-7), ung thư máu (HL-60) và ung thư da (SK-Mel2). Phương pháp theo sáng chế rất hữu ích trong việc làm cơ sở khoa học cho những nghiên cứu ứng dụng tiếp theo nhằm tạo ra các sản phẩm có tác dụng hỗ trợ phòng và điều trị bệnh ung thư từ loài hải miên *Rhabdastrella providentiae* sinh sống ở vùng biển Trung Bộ Việt Nam.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực tìm kiếm các hợp chất tự nhiên mới có nguồn gốc từ sinh vật biển có tác dụng gây độc tế bào trên năm dòng tế bào ung thư người là ung thư gan (HepG2), ung thư phổi (LU -1), ung thư vú (MCF-7), ung thư máu (HL-60) và ung thư da (SK-Mel2). Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến các hợp chất isomalabarican có cấu trúc hóa học mới và phương pháp phân lập các hợp chất này từ loài hải miên *Rhabdastrella providentiae*.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các loài hải miên thuộc giống *Rhabdastrella* đã được phát hiện có khoảng 19 loài, chủ yếu sinh sống ở các rặng san hô thuộc vùng biển nhiệt đới châu á. Mặc dù các loài hải miên thuộc giống *Rhabdastrella* có màu sắc sặc sỡ dễ phát hiện, cơ thể mềm nhưng chúng lại gần như không bị tấn công bởi các động vật khác. Khả năng tự bảo vệ của các loài hải miên *Rhabdastrella* được giải thích phần nào đó do chúng sản sinh ra các hợp chất thứ cấp có khả năng bảo vệ trước sự tấn công của kẻ thù. Do đó, các loài hải miên giống *Rhabdastrella* đã được đánh giá là nguồn cung cấp các hợp chất thứ cấp hứa hẹn cho nghiên cứu và phát triển thuốc. Nghiên cứu đầu tiên về hóa học hải miên giống *Rhabdastrella* được thực hiện bởi nhóm tác giả Trung Quốc trên loài *R. globostellata*. Trong công trình này, các tác giả đã phát hiện được hợp chất axit rhabdastrellic A có cấu trúc hóa học dạng triterpene khung isomalabarican (xem, tài liệu Journal of Natural Products (1997), 60, 1163-1164). Cũng trong thời gian này, nhóm nghiên cứu thuộc Viện ung thư Quốc gia Hoa Kỳ đã phát hiện 7 hợp chất isomalabarican triterpenes có phần mạch nhánh 13,15,17,22,24-pentaen, 22,26-olid hoặc 26-carboxylic từ một loài hải miên thuộc giống *Stelletta*. Các hợp chất này đều được đánh giá là các hợp chất tiềm năng có tác dụng gây độc trên một số dòng tế bào ung thư như ung thư máu, ung thư phổi, ung thư da, ung thư vú...(xem, tài liệu Journal of Natural Products (1997), 60, 431-438). Năm 2001, hai nhà khoa học người Anh, Tabudravu và Jaspars phát hiện 3 hợp chất isomalabarican triterpenes từ loài hải miên *Geodia globostellifera*, trong đó có một hợp chất chứa phần nhánh 13,15,17,25-tetraen và nhóm 22-O-

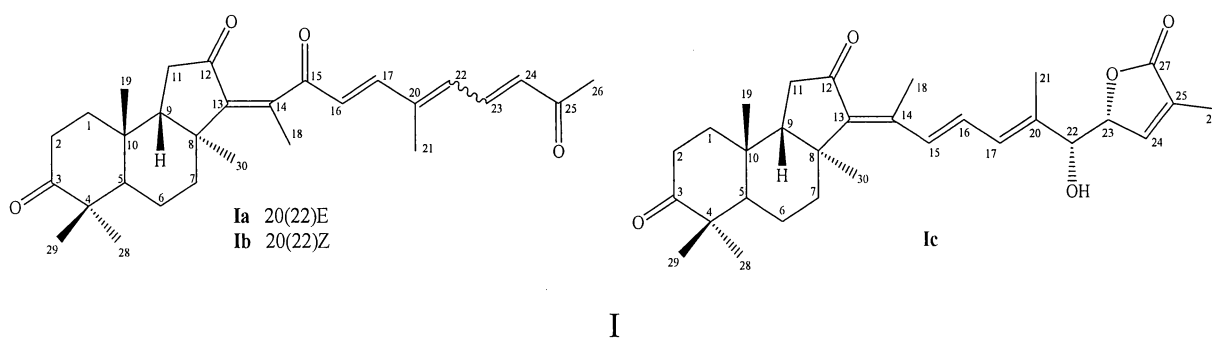
ribopyranosyl. Hợp chất này có tác dụng gây độc tế bào ung thư cổ tử cung A2780 ($IC_{50} = 38.1 \mu\text{g/mL}$) (xem, Journal of Natural Products (2001), 64, 813-815). Một năm sau đó, từ loài hải miên *R. globostellata*, Deniz Tasdemir và cộng sự công bố phát hiện hai hợp chất isomalabaricane với cấu trúc tương tự ở phân nhánh là 13,15,17,22,24-pentaen-26-oic axit nhưng có sự khác biệt ở nhóm 3-axetoxy (xem, Journal of Natural Products (2002), 65, 210-214). Cho đến nay, các nghiên cứu về thành phần hóa học hải miên thuộc giống *Rhabdastrella* vẫn chỉ chủ yếu tập trung ở loài *R. globostellata* và cho thấy thành phần hóa học chính của loài này là các hợp chất triterpen khung isomalabrian. Trên 30 hợp chất có dạng triterpen khung isomalabrian đã được công bố từ loài *R. globostellata* (xem, tài liệu Journal of Natural Products (2008), 71, 1738–1741). Cấu trúc hóa học của các hợp chất này khá đặc biệt, bao gồm một hệ ba vòng ngưng tụ dạng *trans-syn-trans* 6,6,5-tricyclic và một mạch nhánh có cấu trúc đa bất bão hòa. Đặc biệt hơn, qua các phản ứng sinh hóa như oxy hóa, đóng vòng, oxy hóa cắt mạch đã hình thành các hợp chất có sự khác nhau ở cấu trúc mạch nhánh (xem, tài liệu Bioorganic & Medicinal Chemistry (2010), 18, 4639–4647). Do đó, có thể có các hợp chất khung isomalabrian với độ dài mạch nhánh khác nhau, hay với các mức độ oxy hóa khác nhau xuất hiện thêm các nhóm chức rượu, xeton, aldehyt, hay axit trong phân tử. Sự đặc biệt về cấu trúc hóa học của các hợp chất isomalabrian đã cho phép có thể sử dụng các hợp chất này như một yếu tố hóa học để định loại, đánh giá chất lượng của loài hải miên giống *Rhabdastrella*. Bên cạnh đó, các hợp chất isomalabrian phân lập từ loài *R. globostellata* cũng được công bố có hoạt tính gây độc tế bào ung thư rất triển vọng. Một số hợp chất có tác dụng chọn lọc trên một số dòng tế bào ung thư nhất định như các dòng tế bào ung thư máu (HL-60), ung thư vú (MDA-MB-423), ung thư cổ tử cung (HeLa). Cơ chế gây độc tế bào ung thư của các hợp chất isomalabrian cũng được cho thấy dựa trên tác dụng thúc đẩy quá trình apoptosis (xem, tài liệu tài liệu Bioorganic & Medicinal Chemistry (2010), 18, 4639–4647) hay làm tăng sự bền hóa liên kết giữa enzym ADN polymerase β với AND (xem, tài liệu Journal of Natural Products (2006), 69, 373-376).

Trong khuôn khổ đề tài tìm kiếm các chất có khả năng chống ung thư từ nguồn dược liệu hải miên ở vùng biển Trung Bộ Việt Nam, các tác giả sáng chế đã đi sâu nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính gây độc tế bào ung thư của loài hải miên *Rhabdastrella providentiae* thu tại Côn Cỏ, Quảng Trị vào tháng 1 năm 2016. Theo dữ

liệu tra cứu thì đây là nghiên cứu đầu tiên về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài này trên thế giới. Các tác giả sáng chế đã phân lập được một số hợp chất khung isomalabican trong đó có 3 hợp chất có cấu trúc hóa học mới là (13Z,16E,20(22)E,23E)-3,12,15,25-tetraoxo-27-nor-isomalabarican-13,16,20(22),23-tetraen (rhabdastrellin G); (13Z,16E,20(22)Z,23E)-3,12,15,25-tetraoxo-27-nor-isomalabarican-13,16,20(22),23-tetraen (rhabdastrellin H); và (13E,15E,17E,24Z,22R,23R)-22-hydroxy-3,12-dioxoisomalabarican-13,15,17,24-tetraen-23,27-olid (rhabdastrellin I). Các hợp chất này đều được đánh giá tác dụng gây độc tế bào ung thư và nhận thấy đều thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên các dòng tế bào ung thư gồm ung thư gan (HepG2), ung thư phổi (LU -1), ung thư vú (MCF-7), ung thư máu (HL-60) và ung thư da (SK-Mel2). Đặc biệt, hợp chất rhabdastrellin H là một dạng đồng phân hình học của hợp chất rhabdastrellin G nhưng có tác dụng gây độc tế bào ung thư thử nghiệm mạnh hơn hẳn so với hai hợp chất rhabdastrellin G và rhabdastrellin I. Bên cạnh đó, phương pháp phân lập các hợp chất isomalabican từ loài hải miên *Rhabdastrella providentiae* theo sáng chế là dễ thực hiện và cho hiệu suất cao, có thể phát triển thực hiện để tạo sản phẩm có tính ứng dụng trong điều trị/hỗ trợ điều trị ung thư.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất các hợp chất isomalabarican phân lập từ loài hải miên *Rhabdastrella providentiae* có công thức (I):



Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến các hợp chất isomalabarican bao gồm các hợp chất (13Z,16E,20(22)E,23E)-3,12,15,25-tetraoxo-27-nor-isomalabarican-13,16,20(22),23-tetraen (rhabdastrellin G) có công thức (Ia); (13Z,16E,20(22)Z,23E)-3,12,15,25-tetraoxo-27-nor-isomalabarican-13,16,20(22),23-tetraen (rhabdastrellin H) có công thức (Ib); và (13E,15E,17E,24Z,22R,23R)-22-hydroxy-3,12-dioxoisomalabarican-

13,15,17,24-tetraen-23,27-olid (rhabdastrellin I) có công thức (Ic). Các hợp chất isomalabarican theo sáng chế thể hiện tác dụng gây độc tế bào trên 5 dòng tế bào ung thư người thực nghiệm là ung thư gan (HepG2), ung thư phổi (LU -1), ung thư máu (HL-60), ung thư vú (MCF-7) và ung thư da (SK-Mel2) có thể được sử dụng trong điều trị/hỗ trợ điều trị ung thư hay là các hợp chất dẫn đường cho việc phát triển các hợp chất có tác dụng chống ung thư.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp phân lập các hợp chất isomalabarican có công thức (I) từ loài hải miên *Rhabdastrella providentiae*. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất phương pháp phân lập các hợp chất isomalabarican trên đây bao gồm các bước:

- (i) mẫu hải miên *Rhabdastrella providentiae* tươi được rửa bằng nước cất để loại muối, cắt nhỏ và ngâm chiết 3 lần với rượu metylic ở nhiệt độ 40°C với sự hỗ trợ của thiết bị siêu âm, mỗi lần tối thiểu 60 phút;
- (ii) gộp các dịch chiết trong rượu metylic thu được ở bước (i) lại, lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm, thu được dịch cô trong rượu metylic, ký hiệu là dịch cô RPM;
- (iii) dịch cô RPM được hòa tan với nước cất rồi chiết phân bố 3 lần với diclometan theo tỷ lệ 1/1 về thể tích, dịch chiết diclometan được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô diclometan, ký hiệu là dịch cô RPD;
- (iv) dịch cô RPD được tiến hành phân tách trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ rượu metylic trong diclometan là rượu metylic/diclometan tỷ lệ 50/1, 20/1, 10/1 và 0/1 về thể tích, thu được bốn phân đoạn, ký hiệu lần lượt là từ RPD1 đến RPD4;
- (v) hòa tan phân đoạn RPD2 bằng lượng tối thiểu rượu metylic rồi tiến hành phân tách trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 120 μm , hãng sản xuất YMC) với hỗn hợp dung môi rửa giải rượu metylic/nước cất tỷ lệ 3/1 về thể tích, thu được hai phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu lần lượt là RPD2A và RPD2B;
- (vi) tinh chế phân đoạn RPD2A trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 120 μm , hãng sản xuất YMC), sử dụng hỗn hợp dung môi rửa

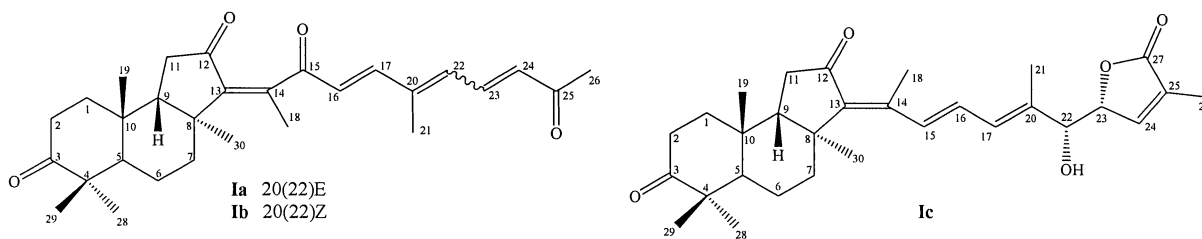
giải gồm axeton/nước cất tỷ lệ 3/1 về thể tích, thu được hợp chất (13*E*,15*E*,17*E*,24*Z*,22*R*,23*R*)-22-hydroxy-3,12-dioxoisomalabarican-13,15,17,24-tetraen-23,27-olid có công thức (Ic) dưới dạng sáp không màu.

- (vii) tinh chế phân đoạn RPD2B trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải gồm diclometan/etyl axetat tỷ lệ 4/1 về thể tích, thu được các hợp chất (13*Z*,16*E*,20(22)*E*,23*E*)-3,12,15,25-tetraoxo-27-nor-isomalabarican-13,16,20(22),23-tetraen có công thức (Ia) dưới dạng sáp không màu; và hợp chất (13*Z*,16*E*,20(22)*Z*,23*E*)-3,12,15,25-tetraoxo-27-nor-isomalabarican-3,16,20(22),23-tetraen có công thức (Ib) dưới dạng sáp không màu.

Mô tả chi tiết sáng chế

Mẫu hải miên *Rhabdastrella providentiae* được thu tại Cồn Cỏ, Quảng Trị vào tháng 1 năm 2016. Tên khoa học của mẫu được GS.TS. Đỗ Công Thung, Viện Tài nguyên và môi trường biển giám định. Mẫu tiêu bản (HM06.2016-01) được lưu tại Phòng Nghiên cứu cấu trúc, Viện Hóa sinh biển. Mẫu hải miên *Rhabdastrella providentiae* được rửa bằng nước cất để loại muối, cắt nhỏ và ngâm chiết 3 lần với rượu metylic ở nhiệt độ 40°C với sự hỗ trợ của thiết bị siêu âm, mỗi lần tối thiểu 60 phút sau đó tiến hành chiết xuất, phân lập, và xác định cấu trúc hóa học theo các phương pháp mô tả dưới đây: Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn (loại DC-Alufolien 60 F254 (Merck 1,05715) hoặc RP18 F254s (Merck)). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254nm và 365nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơi nóng từ từ đến khi hiện màu. Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là silica gel hoặc pha đảo. Silica gel có cỡ hạt là 40-63 µm (230-400 mesh, Merck). Pha đảo RP-18 (120 µm, YMC). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được đo trên máy Bruker DRX500. Phổ khối lượng phân giải cao được đo trên máy Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến các hợp chất isomalabarican có công thức (I):



I

Các hợp chất isomalabarican này là các hợp chất có cấu trúc hóa học mới. Các thông số hóa lý của các hợp chất này như sau:

Hợp chất (13*Z*,16*E*,20(22)*E*,23*E*)-3,12,15,25-tetraoxo-27-nor-isomalabarican-13,16,20(22),23-tetraen có công thức (Ia)

Công thức phân tử: $C_{29}H_{38}O_4$;

Khối lượng phân tử: $M = 450$;

Các thông số vật lý:

+ Chất dạng sáp không màu;

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 451,2838 $[M+H]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $C_{29}H_{39}O_4$, 451,2848;

Hợp chất (13*Z*,16*E*,20(22)*Z*,23*E*)-3,12,15,25-tetraoxo-27-nor-isomalabarican-13,16,20(22),23-tetraen có công thức (Ib)

Công thức phân tử: $C_{29}H_{38}O_4$;

Khối lượng phân tử: $M = 450$;

Các thông số vật lý:

+ Chất dạng sáp không màu;

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 451,2846 $[M+H]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $C_{29}H_{39}O_4$, 451,2848;

Hợp chất (13*E*,15*E*,17*E*,24*Z*,22*R*,23*R*)-22-hydroxy-3,12-dioxoisomalabarican-13,15,17,24 -tetraen-23,27-olid có công thức (Ic)

Công thức phân tử: $C_{30}H_{40}O_5$;

Khối lượng phân tử: $M = 480$;

Các thông số vật lý:

+ Chất dạng sáp không màu;

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 481,2948 $[M+H]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $C_{30}H_{41}O_5$, 481,2954;

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập các hợp chất isomalabarican có công thức (I) từ loài hải miên *Rhabdastrella providentiae* gồm các bước sau:

- (i) mẫu hải miên *Rhabdastrella providentiae* tươi được rửa bằng nước cất để loại muối, cắt nhỏ và ngâm chiết 3 lần với rượu metylic ở nhiệt độ 40°C với sự hỗ trợ của thiết bị siêu âm, mỗi lần tối thiểu 60 phút;
- (ii) gộp các dịch chiết trong rượu metylic thu được ở bước (i) lại, lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm, thu được dịch cô trong rượu metylic, ký hiệu là dịch cô RPM;
- (iii) dịch cô RPM được hòa tan với nước cất rồi chiết phân bố 3 lần với diclometan theo tỷ lệ 1/1 về thể tích, dịch chiết diclometan được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô diclometan, ký hiệu là dịch cô RPD;
- (iv) dịch cô RPD được tiến hành phân tách trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ rượu metylic trong diclometan là rượu metylic/diclometan tỷ lệ 50/1, 20/1, 10/1 và 0/1 về thể tích, thu được bốn phân đoạn, ký hiệu lần lượt là từ RPD1 đến RPD4;
- (v) hòa tan phân đoạn RPD2 bằng lượng tối thiểu rượu metylic rồi tiến hành phân tách trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 120 μm , hãng sản xuất YMC) với hỗn hợp dung môi rửa giải rượu metylic/nước cất tỷ lệ 3/1 về thể tích, thu được hai phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu lần lượt là RPD2A và RPD2B;
- (vi) tinh chế phân đoạn RPD2A trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 120 μm , hãng sản xuất YMC), sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải gồm axeton/nước cất tỷ lệ 3/1 về thể tích, thu được hợp chất (13*E*,15*E*,17*E*,24*Z*,22*R*,23*R*)-22-hydroxy-3,12-dioxoisomalabarican-13,15,17,24-tetraen-23,27-olid có công thức (Ic) dưới dạng sáp không màu.
- (vii) tinh chế phân đoạn RPD2B trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), sử dụng hỗn hợp

dung môi rửa giải gồm diclometan/etyl axetat tỷ lệ 4/1 về thể tích, thu được các hợp chất (13Z,16E,20(22)E,23E)-3,12,15,25-tetraoxo-27-nor-isomalabarican-13,16,20(22),23-tetraen có công thức (Ia) dưới dạng sáp không màu; và hợp chất (13Z,16E,20(22)Z,23E)-3,12,15,25-tetraoxo-27-nor-isomalabarican-3,16,20(22),23-tetraen có công thức (Ib) dưới dạng sáp không màu.

Phương pháp theo sáng chế là dễ thực hiện với hiệu suất cao.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập các hợp chất (13Z,16E,20(22)E,23E)-3,12,15,25-tetraoxo-27-nor-isomalabarican-13,16,20(22),23-tetraen (rhabdastrellin G); (13Z,16E,20(22)Z,23E)-3,12,15,25-tetraoxo-27-nor-isomalabarican-13,16,20(22),23-tetraen (rhabdastrellin H); và (13E,15E,17E,24Z,22R,23R)-22-hydroxy-3,12-dioxoisomalabarican-13,15,17,24-tetraen-23,27-olid (rhabdastrellin I) từ loài hải miên *Rhabdastrella providentiae*

5,0 kg mẫu hải miên *Rhabdastrella providentiae* tươi được rửa bằng nước cất để loại muối, cắt nhỏ và ngâm chiết 3 lần với rượu metylic ở nhiệt độ 40°C với sự hỗ trợ của thiết bị siêu âm, mỗi lần tối thiểu 60 phút.

Các dịch chiết trong rượu metylic thu được được gộp lại, lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm, thu được 80 g dịch cô trong rượu metylic, ký hiệu là dịch cô RPM.

Dịch cô RPM (80 g) được phân bố vào nước cất rồi chiết 3 lần với diclometan theo tỷ lệ 1/1 về thể tích, dịch chiết diclometan được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được 32 g dịch cô diclometan, ký hiệu là RPD.

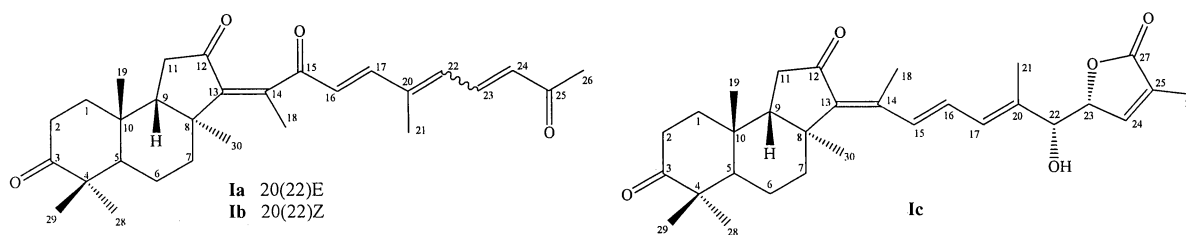
Dịch cô RPD (32 g) được tiến hành phân tách trên cột sắc ký ái lực (Φ 10 cm, L 40 cm) với chất hấp phụ là silica gel (loại Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ rượu metylic trong diclometan tỷ lệ 50/1, 20/1, 10/1 và 0/1 về thể tích thu được bốn phân đoạn, ký hiệu lần lượt là từ RPD1 đến RPD4.

Phân đoạn RPD2 (12 g) được hòa tan bằng lượng tối thiểu rượu metylic rồi tiến hành phân tách trên cột sắc ký ái lực (Φ 5 cm, L 60 cm) với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 120 μ m, YMC) với hỗn hợp dung môi rửa giải rượu metylic/nước cất tỷ lệ 3/1 về thể tích, thu được hai phân đoạn, ký hiệu lần lượt là RPD2A và RPD2B.

Tinh chế phân đoạn RPD2A (1,7 g) trên cột sắc ký ái lực (Φ 2 cm, L 80 cm) với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 120 μ m, YMC), sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 3/1 về thể tích, thu được 43 mg hợp chất (13*E*,15*E*,17*E*,24*Z*,22*R*,23*R*)-22-hydroxy-3,12-dioxoisomalabarican-13,15,17,24-tetraen-23,27-olid dưới dạng sáp không màu.

Tinh chế phân đoạn RPD2B (3,0 g) trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, Merck), sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải gồm diclometan/etyl axetat tỷ lệ 4/1 về thể tích, thu được 38 mg hợp chất (13*Z*,16*E*,20(22)*E*,23*E*)-3,12,15,25-tetraoxo-27-nor-isomalabarican-13,16,20(22), 23-tetraen dưới dạng sáp không màu; và 52 mg hợp chất (13*Z*,16*E*,20(22)*Z*,23*E*)-3,12,15,25-tetraoxo-27-nor-isomalabarican-3,16,20(22),23-tetraen dưới dạng sáp không màu

Các hợp chất isomalabarican thu được có công thức (I):



I

Các thông số hóa lý của các hợp chất này như sau:

Hợp chất (13*Z*,16*E*,20(22)*E*,23*E*)-3,12,15,25-tetraoxo-27-nor-isomalabarican-13,16,20(22),23-tetraen có công thức (Ia)

Công thức phân tử: $C_{29}H_{38}O_4$;

Khối lượng phân tử: $M = 450$;

Các thông số vật lý:

+ Chất dạng sáp không màu;

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 451,2838 $[M+H]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $C_{29}H_{39}O_4$, 451,2848;

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đưa ra trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1: Số liệu phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR (δ , ppm) của hợp chất (13*Z*,16*E*,20(22)*E*,23*E*)-3,12,15,25-tetraoxo-27-nor-isomalabarican-13,16,20(22),23-tetraen

C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (dạng pic, $J = \text{Hz}$)	C	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (dạng pic, $J = \text{Hz}$)
---	------------------	--	---	------------------	--

1	32,3	1,53 (m)/ 2,29 (m)	16	128,6	6,38 (d, 15,5)
2	34,4	2,32 (m)/ 2,91 (m)	17	147,7	7,08 (d, 15,5)
3	214,9	-	18	17,5	2,01 (s)
4	48,1	-	19	23,8	0,90 (s)
5	46,4	2,56 (dd, 2,5, 12,5)	20	144,2	-
6	20,1	1,70 (m)/ 1,72 (m)	21	13,0	2,09 (s)
7	36,5	2,16 (m)/ 2,34 (m)	22	137,4	6,63 (d, 11,5)
8	44,4	-	23	139,5	7,65 (dd, 11,5, 15,5)
9	50,1	2,06 (dd, 6,5, 15,0)	24	134,2	6,38 (d, 15,5)
10	36,1	-	25	201,2	-
11	35,6	2,20 (dd, 6,5, 15,0) 2,29 (dd, 15,0, 15,0)	26	27,6	2,35 (s)
12	206,1	-	27	-	-
13	148,0	-	28	19,8	1,09 (s)
14	144,4	-	29	29,4	1,17 (s)
15	203,4	-	30	24,9	1,53 (s)

^aĐo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz

Hợp chất (13*Z*,16*E*,20(22)*Z*,23*E*)-3,12,15,25-tetraoxo-27-nor-isomalabarican-13,16,20(22),23-tetraen có công thức (Ib)

Công thức phân tử: C₂₉H₃₈O₄;

Khối lượng phân tử: M = 450;

Các thông số vật lý:

+ Chất dạng sáp không màu;

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại *m/z* 451,2846 [M+H]⁺, tính toán lý thuyết cho công thức C₂₉H₃₉O₄, 451,2848;

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đưa ra trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2: Số liệu phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR (δ, ppm) của hợp chất (13*Z*,16*E*,20(22)*Z*,23*E*)-3,12,15,25-tetraoxo-27-nor-isomalabarican-13,16,20(22),23-tetraen

C	δ _C ^{a,b}	δ _H ^{a,c} (dạng pic, <i>J</i> = Hz)	C	δ _C ^{a,b}	δ _H ^{a,c} (dạng pic, <i>J</i> = Hz)
1	32,3	1,54 (m)/ 2,31 (m)	16	129,3	6,35 (d, 15,5)
2	34,4	2,35 (m)/ 2,93 (m)	17	139,1	7,68 (d, 15,5)
3	216,0	-	18	17,5	2,04 (s)
4	48,1	-	19	23,8	0,90 (s)
5	46,5	2,58 (dd, 2,5, 12,5)	20	142,9	-
6	20,1	1,65 (m)/ 1,75 (m)	21	20,4	2,07 (s)
7	36,7	2,21 (m)/ 2,36 (m)	22	135,4	6,53 (d, 11,5)
8	44,5	-	23	137,4	7,66 (dd, 11,5, 15,5)
9	50,3	2,07 (dd, 6,5, 15,0)	24	132,5	6,36 (d, 15,5)

10	36,1	-	25	200,6	-
11	35,6	2,22 (dd, 6,5, 15,0) 3,00 (dd, 15,0, 15,0)	26	28,3	2,34 (s)
12	206,2	-	27	-	-
13	148,4	-	28	19,8	1,09 (s)
14	144,2	-	29	29,4	1,17 (s)
15	203,5	-	30	25,0	1,58 (s)

^aĐo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz

Hợp chất (13*E*,15*E*,17*E*,24*Z*,22*R*,23*R*)-22-hydroxy-3,12-dioxoisomalabarican-13,15,17,24 -tetraen-23,27-olid có công thức (Ic)

Công thức phân tử: C₃₀H₄₀O₅;

Khối lượng phân tử: M = 480;

Các thông số vật lý:

+ Chất dạng sáp không màu;

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại *m/z* 481,2948 [M+H]⁺, tính toán lý thuyết cho công thức C₃₀H₄₁O₅, 481,2954;

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đưa ra trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3: Số liệu phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR (δ, ppm) của hợp chất (13*E*,15*E*,17*E*,24*Z*,22*R*,23*R*)-22-hydroxy-3,12-dioxoisomalabarican-13,15,17,24 -tetraen-23,27-olid

C	δ _C ^{a,b}	δ _H ^{a,c} (dạng pic, <i>J</i> = Hz)	C	δ _C ^{a,b}	δ _H ^{a,c} (dạng pic, <i>J</i> = Hz)
1	32,4	1,53 (m)/ 2,28 (m)	16	133,0	7,08 (dd, 11,0, 15,0)
2	34,4	2,32 (m)/ 2,88 (m)	17	128,7	6,40 (d, 11,0)
3	217,0	-	18	14,8	2,34 (s)
4	48,0	-	19	23,9	0,88 (s)
5	46,5	2,53 (d, 12,5)	20	141,9	-
6	20,6	1,60 (m)/ 1,70 (m)	21	14,0	1,97 (s)
7	39,5	2,25 (m)	22	77,3	4,25 (d, 4,5)
8	46,1	-	23	83,9	5,08 (m)
9	49,2	1,90 (dd, 7,0, 15,5)	24	148,7	7,28 (br s)
10	35,9	-	25	131,8	-
11	37,6	2,20 (dd, 7,0, 15,5) 2,26 (dd, 15,5, 15,5)	26	10,6	1,92 (s)
12	209,6	-	27	176,4	-
13	147,3	-	28	19,8	1,06 (s)
14	143,7	-	29	29,4	1,15 (s)
15	133,9	6,74 (d, 15,0)	30	25,8	1,47 (s)

^aĐo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz

Ví dụ 2: Thử nghiệm về tác dụng dược lý của các hợp chất isomalabarican thu được

Các hợp chất isomalabarican thu được theo sáng chế được thử nghiệm tác dụng gây độc tế bào bằng phương pháp SRB như sau:

Các dòng tế bào ung thư được nuôi cấy dưới dạng đơn lớp trong môi trường nuôi cấy DMEM với thành phần kèm theo gồm 2 mM L-glutamin, 10 mM HEPES, và 1,0 mM natri pyruvat, ngoài ra bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò (fetal bovine serum – FBS) (GIBCO). Tế bào được cấy chuyển sau 3-5 ngày với tỷ lệ 1:3 và nuôi trong tủ ẩm CO₂ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂.

Các hợp chất isomalabarican được pha ở nồng độ gốc là 10 mM trong dimethylsulfoxit (DMSO). Sau đó được pha loãng để có nồng độ cuối cùng trong giếng thử là 100 µM trong các phép thử sàng lọc. Ở các phép thử xác định nồng độ ức chế 50% sự phát triển tế bào ung thư (IC₅₀), các mẫu được tiếp tục pha loãng 5 lần trong 4 lần liên tục để tạo loạt nồng độ bằng DMSO 10%. Các tế bào ung thư được nuôi trong phiên vi lượng 96 giếng, được thử chất, nhuộm bằng SRB (sulforhodamin B) và đo hàm lượng protein tổng số ở bước sóng 515 nm bằng máy đọc vi phiên (Microplate Reader, BioRad). Các hợp chất isomalabarican được chuẩn bị cho thí nghiệm ở các nồng độ 100, 20, 4, và 0,8 µM. Dữ liệu sau đó được phân tích bằng bảng Excel và giá trị IC₅₀ sẽ được xác định nhờ phần mềm Table Curve phiên bản số 4. DMSO 10% là dung môi pha chất được sử dụng như đối chứng âm. Ellipticin được sử dụng làm đối chứng dương.

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác của thí nghiệm và của dữ liệu. Sau quá trình xử lý số liệu bằng phần mềm Table Curve, các trị số IC₅₀ đã được tính toán và cho thấy độ tin cậy cao (sai số p < 0,01). Kết quả được nêu trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4: Kết quả hoạt tính gây độc tế bào *in vitro*

Tên mẫu	Giá trị IC ₅₀ (µM)				
	HepG2	LU-1	MCF-7	HL-60	SK-Mel2
rhabdastrellin G	84,7 ± 3,5	84,8 ± 6,7	77,9 ± 4,5	56,1 ± 4,1	75,4 ± 4,8
rhabdastrellin H	14,0 ± 2,1	14,8 ± 1,3	16,0 ± 2,0	14,8 ± 1,3	11,2 ± 1,4
rhabdastrellin I	71,3 ± 4,0	63,4 ± 2,5	63,8 ± 3,9	46,3 ± 2,6	75,5 ± 6,7
Ellipticin	2,0 ± 0,3	1,9 ± 0,2	1,7 ± 0,2	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,3

Như vậy, các hợp chất isomalabarican thu được đều thể hiện hoạt tính gây độc

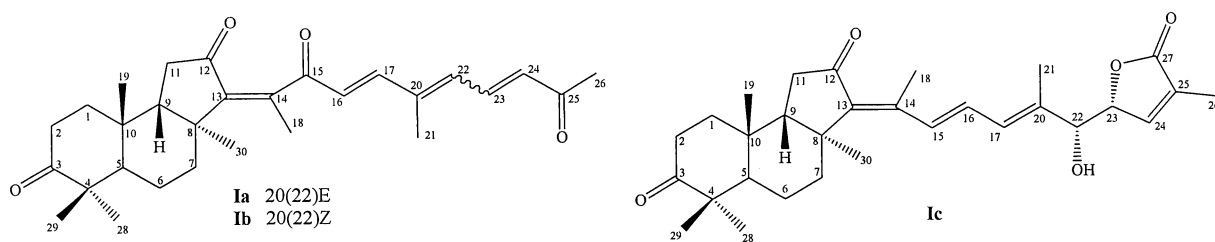
trên cả năm dòng tế bào ung thư người thực nghiệm là ung thư gan (HepG2), ung thư phổi (LU -1), ung thư vú (MCF-7), ung thư máu (HL-60), và ung thư da (SK-Mel2) với giá trị IC_{50} trong khoảng từ $11,2 \pm 1,4 \mu M$ đến $84,8 \pm 6,7 \mu M$. Trong đó, hợp chất rhabdastrellin H thể hiện hoạt tính tốt hơn cả với giá trị IC_{50} từ $11,2 \pm 1,4 \mu M$ tới $16,0 \pm 2,0 \mu M$.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập được các hợp chất isomalabarican mà là (13Z,16E,20(22)E,23E)-3,12,15,25-tetraoxo-27-nor-isomalabarican-13,16,20(22),23-tetraen (rhabdastrellin G); (13Z,16E,20(22)Z,23E)-3,12,15,25-tetraoxo-27-nor-isomalabarican-13,16,20(22),23-tetraen (rhabdastrellin H); và (13E,15E,17E,24Z,22R,23R)-22-hydroxy-3,12-dioxoisomalabarican-13,15,17,24-tetraen-23,27-olid trên đây từ loài hải miên *Rhabdastrella providentiae*, cụ thể là được thu ở vùng biển Cồn Cỏ, Quảng Trị. Các hợp chất thu được theo sáng chế đều thể hiện hoạt tính gây độc trên cả năm dòng tế bào ung thư người thực nghiệm là ung thư gan (HepG2), ung thư phổi (LU-1), ung thư vú (MCF-7), ung thư máu (HL-60), và ung thư da (SK-Mel2). Trong đó, hợp chất rhabdastrellin H có hoạt tính gây độc tế bào ung thư thử nghiệm mạnh hơn hẳn so với hai hợp chất rhabdastrellin G và I. Sáng chế tạo cơ sở khoa học cho phát triển các hợp chất isomalabricane nhằm tạo ra các dược phẩm có tác dụng phòng và điều trị bệnh ung thư từ nguồn dược liệu biển, cụ thể là từ loài hải miên *Rhabdastrella providentiae* ở vùng biển Trung Bộ Việt Nam.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Các hợp chất isomalabarican có công thức (I):



I

2. Phương pháp phân lập các hợp chất isomalabarican có công thức (I) theo điểm 1 từ loài hải miên *Rhabdastrella providentiae*, phương pháp này bao gồm các bước:

- (i) mẫu hải miên *Rhabdastrella providentiae* tươi được rửa bằng nước cất để loại muối, cắt nhỏ và ngâm chiết 3 lần với rượu metylic ở nhiệt độ 40°C với sự hỗ trợ của thiết bị siêu âm, mỗi lần tối thiểu 60 phút;
- (ii) gộp các dịch chiết trong rượu metylic thu được ở bước (i) lại, lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm, thu được dịch cô trong rượu metylic, ký hiệu là dịch cô RPM;
- (iii) dịch cô RPM được hòa tan với nước cất rồi chiết phân bố 3 lần với diclometan theo tỷ lệ 1/1 về thể tích, dịch chiết diclometan được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô diclometan, ký hiệu là dịch cô RPD;
- (iv) dịch cô RPD được tiến hành phân tách trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ rượu metylic trong diclometan là rượu metylic/diclometan tỷ lệ 50/1, 20/1, 10/1 và 0/1 về thể tích, thu được bốn phân đoạn, ký hiệu lần lượt là từ RPD1 đến RPD4;
- (v) hòa tan phân đoạn RPD2 bằng lượng tối thiểu rượu metylic rồi tiến hành phân tách trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 120 μm , YMC) với hỗn hợp dung môi rửa giải rượu metylic/nước cất tỷ lệ 3/1 về thể tích, thu được hai phân đoạn nhỏ hơn, ký hiệu lần lượt là RPD2A và RPD2B;
- (vi) tinh chế phân đoạn RPD2A trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 120 μm , YMC), sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải gồm axeton/nước cất tỷ lệ 3/1 về thể tích, thu được hợp chất

(13*E*,15*E*,17*E*,24*Z*,22*R*,23*R*)-22-hydroxy-3,12-dioxoisomalabarican-13,15,17,24-tetraen-23,27-olid có công thức (Ic) dưới dạng sáp không màu.

- (vii) tinh chế phân đoạn RPD2B trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, Merck), sử dụng hỗn hợp dung môi rửa giải gồm diclometan/ethyl axetat tỷ lệ 4/1 về thể tích, thu được các hợp chất (13*Z*,16*E*,20(22)*E*,23*E*)-3,12,15,25-tetraoxo-27-nor-isomalabarican-13,16,20(22),23-tetraen có công thức (Ia) dưới dạng sáp không màu; và hợp chất (13*Z*,16*E*,20(22)*Z*,23*E*)-3,12,15,25-tetraoxo-27-nor-isomalabarican-3,16,20(22),23-tetraen có công thức (Ib) dưới dạng sáp không màu.